Aus dem Institut für Angewandte Physiologie in Marburg
Ehemaliger Direktor: Prof. Dr. med. D. W. Lübbers

Myoglobin als Indikator für die zeitliche Änderung der Gewebsatmung während der Muskelkontraktion

Spektralphotometrische Untersuchungen am isolierten, hämoglobinfrei perfundierten Musculus gastrocnemius der Ratte in vivo

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades in der gesamten Medizin
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philippsuniversität Marburg an der Lahn

vorgelegt von
Elfriede Katharina Follert
aus Seligenstadt

Marburg 1969

Fotodruck: Erich Mauersberger, Marburg

Aus dem Institut für Angewandte Physiologie in Marburg
Ehemaliger Direktor: Prof. Dr. med. D. W. Lübbers

Myoglobin als Indikator für die zeitliche Änderung der Gewebsatmung während der Muskelkontraktion

Spektralphotometrische Untersuchungen am isolierten, hämoglobinfrei perfundierten Musculus gastrocnemius der Ratte in vivo

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades in der gesamten Medizin
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philippsuniversität Marburg an der Lahn

vorgelegt von
Elfriede Katharina Follert
aus Seligenstadt

Marburg 1969

Fotodruck: Erich Mauersberger, Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Marburg am: 24.4.1969

gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan: Prof. Dr. med. W. Straub

Referent: Prof. Dr. med. D. W. Lübbers

Correferent: Prof. Dr. med. M. Siess

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung	1
II. Methodik	3
1. Perfusionsapparatur	3
2. Perfusionslösung	5
a) Zusammensetzung	5
b) Papaverinzusatz	6
c) Oxygenierung	6
d) pH-Einstellung	6
e) Temperaturmessung	6
f) Perfusionsgeschwindigkeit- und druck	7
3. Rapidspektrophotometer	8
4. Muskelreizung und Registrierung der Kontraktion mit Hilfe von Dehnungsmeßstreifen	9
5. Aufnahme der Spektren	10
6. Herstellung von Muskelhomogenat	11
7. Auswertung der Spektren	12
III. Resultate	16
1. Entwicklung eines isolierten Gefäß-Muskelpräparates	16
2. Befestigung des Präparates unter dem Photomultiplier des Rapidspektrophotometers	20

Seite

3. Versuchsablauf der in vivo Perfusion 22

4. Bestimmung der Absorptionsbanden und der Kurvenschnittpunkte des Muskelhomogenats 24

5. Absorptionsbanden und Kurvenschnittpunkte des Muskels in vivo 29

6. Oxygenierungsgrad des Myoglobins im perfundierten Muskel in Hypothermie ohne und mit Papaverinzusatz , gemessen an der α Bande. 34

7. Kinetik des Myoglobins bei Ischämie und Reperfusion in Hypothermie 36

8. Verhalten des Myoglobins während der Kontraktion und der nachfolgenden Erholungszeit in Hypothermie 41

9. Durchblutung und Kontraktion 50

IV. Diskussion 51

V. Zusammenfassung 61

VI. Literaturnachweis 63

1. E i n l e i t u n g

Von allen tierischen Geweben enthält nur der Muskel im Protoplasma seiner Zellen ein besonderes Pigment, das Myoglobin, das funktionell zwischen den Sauerstoffträgern des Blutes und der Atmungskette in den Mitochondrien, wo der Sauerstoff verbraucht wird, eingelagert ist. THEORELL (1932) [27] gelang es erstmalig, das Myoglobin aus dem Pferdeherzen kristallin darzustellen. Auf die funktionelle Bedeutung wies besonders MILLIKAN hin (1936) [20], (1937) [21], der im Myoglobin einen Sauerstoffspeicher sah zur Deckung des erhöhten O_2-Bedarfs bei Änderung der Muskeltätigkeit.

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, das Myoglobin als Indikator für die Änderung der Gewebsatmung und die Kinetik bei Ischämie und Arbeit des Skelettmuskels darzustellen. MILLIKAN hat bisher als einziger die Sauerstoffabgabe bei Kontraktion des Muskels mit zwei Photozellen untersucht. Er fand, daß die Entsättigung nach weniger als 1/5 Sekunde nach Beginn der Kontraktion einsetzt. Seine Versuche sind jedoch aus methodischen Gründen angreifbar. Wir haben deshalb die Fragestellung wieder aufgegriffen.

Zur Erfassung der Reaktionen des Myoglobins eignet sich besonders das Rapidspektrophotometer von LÜBBERS und NIESEL [16, 18, 23], mit dem es gelingt, schnelle Reaktionen im Gewebe zu registrieren. Da das Absorptionsspektrum des Muskelfarbstoffes im oxygenierten und im desoxygenierten Zustand dem des Hämoglobins in seiner Form

sehr ähnlich ist, und die Banden im sichtbaren Bereich nur um wenige Nanometer zum Roten verschoben sind, läßt sich das Myoglobinspektrum nur schwer vom Hämoglobinspektrum trennen. Daher haben wir bei unseren Versuchen das Hämoglobin durch Perfusion entfernt und den Muskel mit einem Hb-freien, O_2-gesättigten Medium versorgt.

Die Experimente wurden am isolierten Musculus gastrocnemius der Ratte und aus methodischen Gründen in Hypothermie von 25 bis 29 ^{o} C durchgeführt.

Da das MbO_2 erst bei einem O_2 -Druck von weniger als 30 Torr seinen Sauerstoff abgibt, ist es nur in einem beschränkten Bereich als Indikator geeignet.

Unsere Versuche haben ergeben, daß die Entsättigung des Myoglobins bei Kontraktion bei Tetani von 3 - 10 Sekunden schon während der Muskelzuckung beginnt und sein Maximum kurz nach Beendigung der Kontraktion erreicht.

Bei hämoglobinfreier Perfusion des Muskels, die in normaler äußerer Luftatmosphäre durchgeführt wird, zeigt sich unter bestimmten Bedingungen eine Konkurrenz zwischen Perfusionssauerstoff und Luftsauerstoff am Myoglobin, wie die Ischämieversuche ergaben. Die Diffusion von außen ist daher bei der Darstellung der Kinetik des Myoglobins zu beachten.

II. M e t h o d i k

1. Perfusionsapparatur (Abb. 1)

Von einem Scheibenoxygenator, der zur Oxygenierung und Thermostatisierung dient, wird das Medium durch eine Rollenpumpe nach SCHNITTGER mit verstellbarer Umdrehungsgeschwindigkeit über ein zusammengesetztes System aus Glasröhren und Schläuchen zum isolierten Gefäß-Muskelpräparat befördert. Bevor es in dieses gelangt, wird seine Temperatur mittels einer Sonde, der Perfusionsdruck mittels eines Steigrohres gemessen. (Abb. 1) Weiterhin verhindert eine Luftfalle ein Eindringen von Gasbläschen in die Gefäße. Selbst die allerkleinsten Bläschen, wie sie bei der Oxygenierung durch den mechanischen Druck der sich drehenden Scheiben entstehen können, verstopfen die Kapillaren. Wir sahen, falls Bläschen im Medium vorhanden, keinerlei Reaktionen des Myoglobins und der Atmungsfermente. Die Blutersatzflüssigkeit fließt über einen in die freipräparierte und isolierte Aorta eingebundenen Polyvinylchlorid-Katheter in die Arteria femoralis. Nach Passage des Muskelkapillarstromgebietes fließt sie über die Vena femoralis und über einen in die Vena cava inferior eingeführten PVC-Katheter in ein Auffanggefäß.

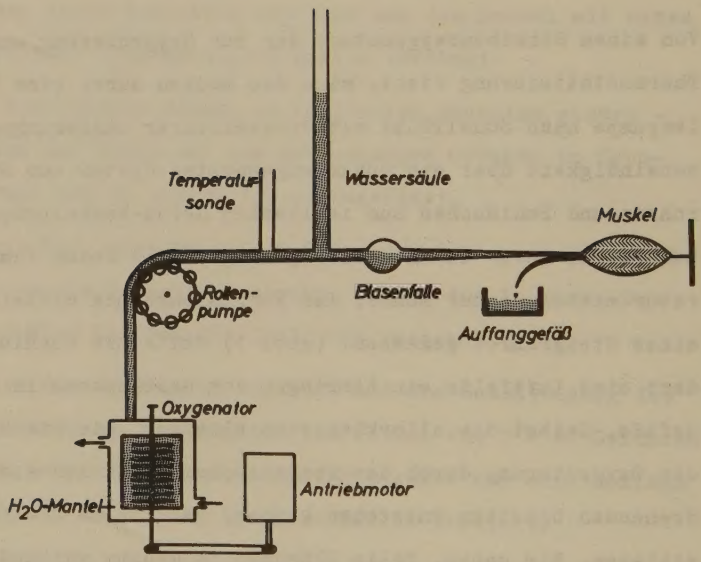

Abb. 1 Schema der Perfusionsapparatur

2. Perfusionslösung

a) Zusammensetzung

Zunächst durchströmten wir den Muskel mit Tyrodelösung. Das führte jedoch in allen Fällen schon nach wenigen Minuten zu einem starken Ödem. Nach weiteren orientierenden Versuchen mit inaktiviertem Rindercitratplasma und 7%-igen Makrodexlösungen benutzten wir Hämaccellösungen, wie sie als Infusionen für die Klinik geliefert werden. Diese enthalten in 100 ml Lösung neben 3,5 g Hämaccel

0,85 g NaCl
0,038 g KCl
0,07 g $CaCl_2$

sowie Aqua dest. steril. pyrogenfrei ad 100 ml.
Dieser Lösung wurden jeweils 0,5 mMol $MgCl. 6H_2O$
0,7 mMol NaH_2PO_4
23,0 mMol $NaHCO_3$
und 5,5 mMol Glucose
zugesetzt.

Auch mit diesem Medium konnten wir nicht unbegrenzt perfundieren. Nach etwa dreiviertel bis einer Stunde Perfusion trat häufig auch hier ein Ödem auf. Wir beschränkten deshalb unsere Untersuchungen auf die erste Dreiviertelstunde.

b) Papaverinzusatz

Bei einem Teil der Versuche setzten wir 0,2 ml Papaverin. hydrochl. pro 500 ml Medium zu, das entspricht 0,008 g. Dabei senkte sich deutlich der Perfusionsdruck.

c) Oxygenierung

Das Medium wurde in einem Scheibenoxygenator aus Plexiglas mit einem Gasgemisch von 95% O_2 und 5% CO_2, das in einer Waschflasche befeuchtet wurde, vor dem Versuch jeweils 40 Minuten begast.

d) pH-Einstellung

Das pH der Lösung wurde mit dem pH Meter 4 (Radiometer Copenhagen) gemessen. Die Eichung des Gerätes erfolgte mit zwei Pufferlösungen von pH 5,00 und 8,00. Nach Aufsättigung mit dem Gas betrug das pH des Mediums 7,30.

e) Temperaturmessung

Die Temperatur des Mediums wurde mit einer Ellab-Durchfluß-sonde auf 1/10 ^{o} C genau kurz vor dem Einstrom in die Aorta gemessen. Ebenso wurde die Oberflächentemperatur des Muskels mit einer Oberflächensonde während der Perfusion diskontinuierlich registriert.

Die Versuche wurden bei einer Temperatur des Mediums von 25 bis 29 ^{o} C und in einem Fall bei 35 ^{o} C ausgeführt. Zur Erwärmung

wurde der Oxygenator, der mit einem Plexiglasmantel versehen ist, von einem Haake-Ultra-Thermostat aufgeheizt. Bei den niederen Temperaturen genügte dieses Verfahren. Bei dem Experiment bei 35 ^{o} C wurde das Medium außer im Oxygenator nochmals unmittelbar vor dem Einstrom in die Aorta thermostatisiert, da aufgrund der geringen Flußgeschwindigkeit eine zu starke Abkühlung in den Schläuchen erfolgte. Dennoch war ein Temperaturabfall entlang des kurzen Katheterstückchens zu verzeichnen. Um diesen weitgehend auszuschalten, haben wir schließlich den Versuch bei einer Zimmertemperatur von 30 bis 35 ^{o} C ausgeführt.

f) Perfusionsgeschwindigkeit und -druck

Vor jedem Versuch wurde eine Grobeichung der Flußgeschwindigkeit, die durch eine Rollenpumpe nach SCHNITTGER regelbar war, vorgenommen. Nach dem Versuch wurde die genaue Flußmenge pro Minute aus dem aufgefangenen venösen Rückstrom berechnet. Die Flußgeschwindigkeiten lagen zwischen 0,7 und 2,4 ml pro Minute und pro Muskelpräparat. Das mittlere Frischgewicht des perfundierten Muskels betrug 1,5 g. Der Druck wurde mit einem Steigrohr gemessen. Er bewegte sich zwischen 35 und 120 cm Wassersäule, abhängig vom Papaverinzusatz und vom Durchströmungsvolumen.

3. Rapidspektrophotometer

Das Rapidspektrophotometer nach LÜBBERS und NIESEL [16, 18, 23], ein Zwei-Strahl-Absorptionsspektralphotometer, ist aufgrund seiner geringen Registrierzeit zur Erfassung von schnell ablaufenden Absorptionsänderungen in vitro und in vivo besonders geeignet. Es kann innerhalb von 10 Millisekunden ein größerer Bereich des Spektrums abgetastet und auf einem Sichtgerät dargestellt werden. Der Wellenlängenbereich wurde auf etwa 530 bis 620 Nanometer eingestellt. Die Versuche in vivo wurden im reflektierten Licht mit einem Reflexionsmeßkopf durchgeführt.

Die Meßfeldgröße auf der Oberfläche des Muskel betrug 2 mal 3 mm^2 .

4 Muskelreizung und Registrierung der Kontraktion mit Hilfe von Dehnungsmeßstreifen

Der Muskel wird während der Perfusion direkt elektrisch gereizt. Eine Elektrode wird an einen von zwei Metallpflöcken gelegt, zwischen denen das eine Ende des Muskels befestigt ist, die andere, ein chlorierter Silberdraht, um das distale Ende des Muskels geschlungen. (s. Abb. 4). Die Reizfrequenz beträgt 25 hz, die Dauer eines Reizimpulses 1 ms, die Spannung 10 V. Es werden damit Tetani von 3, 5 oder 10 Sekunden ausgelöst. Zur Registrierung der Kontraktion des Muskels werden zwei Dehnungsmeßstreifen [14] (Konstantandraht) verwandt, die auf beiden Seiten eines Metallstreifens aufgeklebt sind. Der Metallstreifen ist fest zwischen zwei Blökken aus Trovidur eingespannt. Die Bewegungen des Metallstreifens, an den der Muskel über einen Haken befestigt ist, übertragen sich auf den Konstantandraht, wodurch Widerstandsschwankungen des Drahtes entstehen.

Die zwei Dehnungsmeßstreifen, die ohne Dehnung einen Widerstand von jeweils 120 Ohm haben, sind mit noch zwei anderen Widerständen von gleicher Ohmzahl zu einer Wheatstone'schen Brücke geschaltet. Bei Änderung des Widerstandes der Dehnungsmeßstreifen, hervorgerufen durch die Dehnung bzw. Stauchung der Konstantandrähte während der Muskelkontraktion, fließt infolge der Ungleichheit der Widerstände in der Brücke ein Strom, der über einen Verstärker von einem Meßinstrument angezeigt und gleichzeitig auf einem Schreiber, dem Physioscript ST9s 17, mitregistriert wird.

5. Aufnanme der Spektren

Die Spektren werden während des Versuches von dem Sichtgerät, auf dem sie als Extinktionsspektren dargestellt sind, abfotografiert. Das Rapidspektrophotometer ist dazu mit einer besonderen Vorrichtung versehen.

Zur Eichung der Wellenlänge wird gleichzeitig ein Neodym-Testfilter mit bekannten Absorptionsmaxima mitfotografiert.

6. Herstellung von Muskelhomogenat

Der mit Hämaccellösung perfundierte Muskel wird nach Injektion von 1 ml gesättigtem Amytal mit Fließpapier abgetupft, mit einer Schere zerkleinert und auf einer Analysenwaage abgewogen. Im Verhältnis 1:10 wird er mit dem Perfusionsmedium verdünnt. Mit einem Ultra-Turrax wird dieses Gemisch etwa 30 Sekunden im Eisbad homogenisiert. Das Homogenat wird eine halbe Stunde mit einem Gasgemisch von 95% Sauerstoff und 5% CO_2 durchperlt, um das Myoglobin in Oxymyoglobin zu überführen.

Das Homogenat wird zur photometrischen Messung in Küvetten von 0,5 cm Durchmesser eingefüllt. In eine der beiden werden zusätzlich einige Kristalle $Na_2S_2O_4$ zugegeben, um das Homogenat völlig zu desoxygenieren. Die photometrischen Bestimmungen wurden im durchfallenden und im reflektierten Licht vorgenommen.

7. Auswertung der Spektren +

Bestimmung des Oxygenierungsgrades der α-Bande des Myoglobins

Zur Auswertung werden die aufgenommenen Spektren vergrößert und die Tangenten an den α-Peak angelegt.

Dann wird der Winkel φ gemessen.

In der Abbildung 2 sind ein oxygeniertes und ein reduziertes Spektrum übereinanderprojiziert.

Die α-Bande des Myoglobins im oxygenierten und desoxygenierten Zustand ist nochmals schematisch in der Abbildung 3 dargestellt.

Als Winkel α ist der Winkel bezeichnet, den das desoxygenierte Spektrum mit der Waagerechten bildet.

h ist die Senkrechte, die vom Winkel φ auf das desoxygenierte Spektrum gefällt wird.

φ ist der Winkel zwischen der linken Tangente am α-Peak des oxygenierten Myoglobins und der Höhe h.

Ableitung:

$$\operatorname{tg}\beta = -\frac{b}{a}$$

$$\operatorname{tg}\alpha = -\frac{h-b}{a} = -\frac{h}{a} - -\frac{b}{a} = -\frac{h}{a} - \operatorname{tg}\beta$$

$$h = (\operatorname{tg}\alpha + \operatorname{tg}\beta) \cdot a$$

$$h_{ox} = (\operatorname{tg}\alpha + \operatorname{tg}\beta_{ox}) \cdot a$$

$$\text{Oxygenierungsgrad} = \frac{h}{h_{ox}} \cdot 100\%$$

$$= \frac{\operatorname{tg}\alpha + \operatorname{tg}\beta}{\operatorname{tg}\alpha + \operatorname{tg}\beta_{ox}} \cdot 100\%$$

$\operatorname{tg}\beta = \operatorname{ctg}\varphi$, wie sich aus der Abb. 3 ergibt.

$$\text{Oxygenierungsgrad} = \frac{\operatorname{tg}\alpha + \operatorname{ctg}\varphi}{\operatorname{tg}\alpha + \operatorname{ctg}\varphi_{ox}} \cdot 100\%$$

Die Fehlerbreite beträgt bei diesem Auswertungsverfahren

$\pm$ 3%

+ Herrn Dr. R. Wodick bin ich für die Hilfe bei der Auswertung der Spektren zu Dank verpflichtet.

voll oxygeniertes und voll reduziertes Myoglobinspektrum im Gewebe

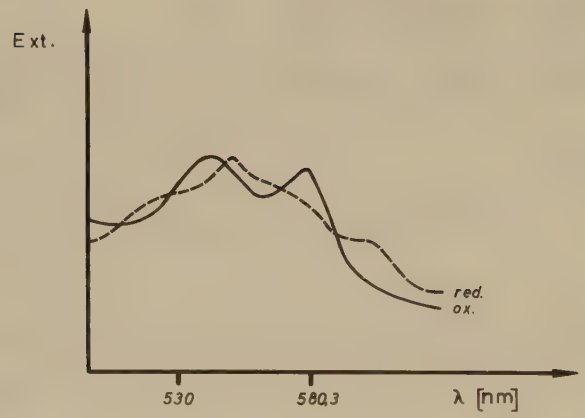

Abbildung 2

zeigt neben der α- und β-Bande des oxygenierten Myoglobins noch die Absorptionsbanden des entsättigten Muskels mit den α Banden des reduzierten Cytochroms a_3 bei 603 - 605 nm und Cytochromsc bei 551 nm

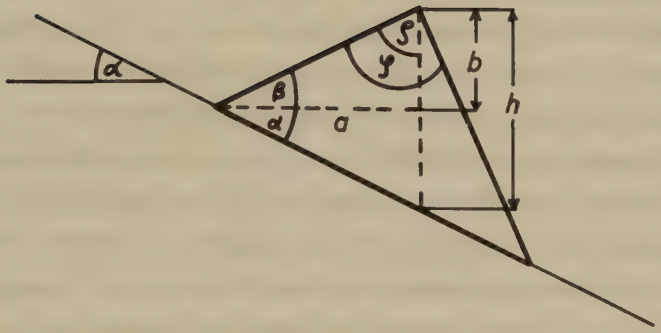

Abbildung 3

Schematische Darstellung des α-Peaks des Myoglobins im oxygenierten und desoxygenierten (reduzierten) Zustand

III. R e s u l t a t e

1. Entwicklung eines isolierten Gefäß-Muskelpräparates

Als Versuchstiere wurden weibliche Albinoratten mit einem Gewicht von 160 bis 250 Gramm verwandt. Bei schwereren Tieren war der Fettgehalt so hoch, daß sich die Präparation der Gefäße erschwerte. Die Ratte wurde mit Nembutal (R) (Pentobarbital Natrium) narkotisiert, 40 Milligramm pro Kilogramm Körpergewicht. Mit dieser Dosierung befanden wir uns im Toleranzstadium der Narkose, so daß wir ohne künstliche Beatmung die relativ lang dauernde Operation vornehmen konnten. 15 bis 20 Minuten nach der Injektion des Narkosemittels wurde mit der Operation begonnen.

Unser Ziel war zunächst, eine ausreichende Durchströmung und Versorgung der Oberschenkelmuskulatur zu erzielen, die uns zur Perfusion am geeignetesten erschien. Zuerst versuchten wir, von der Arteria femoralis aus zu perfundieren. Da dieses Gefäß sehr eng ist und man daher nur einen entsprechend engen Katheter einbinden kann, gelang es nicht, eine ausreichende Menge Medium durchzupumpen. Ebenfalls erwies sich die Arteria iliaca für eine Perfusion zu eng. Deshalb gingen wir von der Aorta abdominalis aus vor.

Die Haut der unteren linken Extremität wird bis zum Fuß abpräpariert. Um eine Austrocknung zu vermeiden, wird die freigelegte Muskulatur mit einem mit warmer Tyrodelösung angefeuchteten Mullstreifen bedeckt. Dann präpariert man die Haut

vom Abdomen ab und eröffnet die Peritonealhöhle durch einen Längsschnitt durch die Bauchdeckenmuskulatur und durch das Peritoneum in der Medianlinie proximal der Symphyse bis distal des Processus xiphoides. Nach Auseinanderklappen der Bauchdecken werden die Darmschlingen mit Hilfe von zwei Mulltupfern nach links eventeriert, um einen freien Zugang zum Retroperitonealraum zu gewinnen. Aorta abdominalis und Vena cava inferior werden aufgesucht und alle unterhalb der Nierengefäße lateral und dorsal von der Aorta abgehenden und alle in die Vena cava mündenden Gefäße sowie die Seitenäste der Arteria und Vena iliaca sinistra bis zum ligamentum inguinale abgebunden. Etwa 10 Minuten vor dem Einführen der Katheter injiziert man 0,1 ml Liquemin(R) in die rechte Vena femoralis, um einer intravasalen Blutgerinnung vorzubeugen. Der Katheter für den arteriellen Zustrom wird in die Aorta abdominalis unterhalb des Abganges der Vasa renalia eingebunden und ein zweiter Katheter für den venösen Abfluß in die Vena cava caudalis. Nach dem Einbinden sind noch die Arteria und Vena iliaca dextra distal der Aortenbifurkation zu ligieren. Auf diese Weise gelingt es, ein ausreichendes Durchflußvolumen zu erzielen.

Bei diesem Vorgehen wird der gesamte linke Oberschenkel perfundiert, da eine Ligatur unmittelbar unterhalb des Ansatzes des Quadriceps an der Tibia den linken Unterschenkel von der Versorgung ausschließt. Dabei bleibt die versorgte Muskulatur in situ.

Aus methodischen Gründen erstrebten wir dann ein vom Organismus isoliertes Gefäß-Muskelpräparat. Die Operation wird bis zum Ligamentum inguinale, wie oben beschrieben, vorgenommen und dann nach Reichel+ modifiziert. Dabei wird die Arteria femoralis weiter frei präpariert bis zur Mitte des Oberschenkels und eine Ligatur unmittelbar oberhalb des Knies um die Arteria femoralis gelegt.

Die Achillessehne wird mit einem Supramidfaden umschlungen und vom Calcaneus abgetrennt. Man präpariert nun den Musculus gastrocnemius von distal nach proximal bis dicht unterhalb der Kniekehle von der übrigen Unterschenkelmuskulatur ab und durchtrennt dann den Unterschenkel unterhalb einer Sicherheitsligatur. Ebenso wird der Oberschenkel hinter der freipräparierten Arteria femoralis durchgeschnitten. Nun bohrt man durch den distalen Teil des Femurs längs des Knochenmarks einen Kanal, der oberhalb des Kniegelenks mündet und steckt einen Metallstab hindurch, der zur Befestigung des Muskels dienen soll.

+ Herrn Prof. Dr. Reichel und Fräulein Hagemeier danke ich für die Beratung bei der Präparation.

Ein PVC -Katheter wird in die Aorta abdominalis eingeführt und doppelt festgebunden. Während des Einbindens lassen wir die Perfusion bereits laufen, um den Sauerstofftransport nicht zu unterbrechen. Anschließend wird die Vena cava eröffnet und ebenso ein PVC-Katheter eingeführt. Aorta und Cava werden oberhalb der eingebundenen Katheter durchtrennt, so daß Muskel und ihn versorgende Gefäße völlig aus dem Organismus der Ratte herausgelöst und auf einem eigens dafür konstruierten Muskelhaltebrett mit Hilfe des Metallstabes befestigt werden können.

Die Präparation mit Anschluß der Perfusion dauert insgesamt 50 bis 60 Minuten.

2. Befestigung des Muskels unter dem Photomultiplier des Rapidspektrophotometers

Nach der Präparation und nach Anschluß der Perfusion wird der Muskel mit Aorta und Vena cava aus dem Organismus der Ratte völlig herausgelöst und auf einer dafür eigens konstruierten Vorrichtung befestigt. Diese besteht aus einem Brett, auf dem zwei Metallpflöcke aufgebracht sind, zwischen denen der Metallstab, an dem der Muskel hängt, befestigt wird. Das distale Ende des Muskels wird über einen Faden an der Achillessehne an einen Haken geknüpft, der von einem Metallstreifen abgeht (s. Abb. 4).

Das Brett wird auf einen Mikromanipulator aufgesetzt, um feinste Bewegungen unter dem Photomultiplier ausführen zu können.

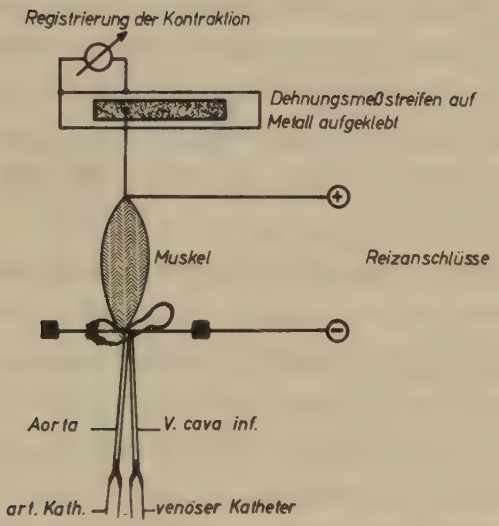

Abbildung 4

Schematische Zeichnung der Befestigung des isolierten Gefäß-Muskelpräparates

3. Versuchsablauf der in vivo Perfusion

Nach Anschluß der Perfusion und Befestigung des Muskels unter dem Photomultiplier wird der Muskel etwa 15 Minuten durchströmt, um das Hämoglobin auszuspülen. Während dieser Zeit werden Oberflächentemperatur, arterielle Temperatur sowie Perfusionsdruck bestimmt. Nach dieser Zeit ist das ausfließende Medium völlig klar, so daß mit der Muskelreizung begonnen werden kann.

Zunächst führen wir bei jedem Versuch eine Ischämiereaktion durch Abklemmen der Perfusion durch. Diese dient zur Beurteilung der Güte des Präparates. Zeigt das Myoglobinspektrum innerhalb von drei Minuten keine deutliche Veränderung in Richtung Desoxygenierung, wird der Versuch abgebrochen, da eine Störung vorliegen muß. Als Ursache dieser mißglückten Versuche erwiesen sich selbst bei ausreichendem Fluß und gut eingestelltem Druck immer wieder Gasblasen im Medium.

Nach entsprechender Entsättigung des Myoglobins durch die Ischämie wird der Versuch fortgesetzt, indem sich durch Reperfusion das Myoglobin wieder mit Sauerstoff aufsättigt. Dann lassen wir den Muskel sich kontrahieren, indem wir ihn mit der oben beschriebenen Reizfrequenz- und -stärke reizen. Während eines Versuches führen wir nur zwei Kontraktionen mit nachfolgender Erholungszeit durch, da die Perfusionszeit auf 45 bis 50 Minuten beschränkt werden muß. Nach dieser Zeit

ist trotz niedrigen Druckes und möglichst niedriger Flußgeschwindigkeit dennoch mit einem Ödem zu rechnen.

Am Ende des Versuches injizieren wir 1 ml gesättigtes Amytal [26] und anschließend 1 ml 0,5 molare Natriumdithionitlösung, um ein völlig oxygeniertes und ein völlig desoxygeniertes reduziertes Spektrum zu erhalten, die als Basis zur Auswertung der Spektren dienen. Nach dem Versuch wird jeweils das Gewicht des perfundierten sowie das des nichtperfundierten Gastrocnemius der zweiten hinteren Extremität bestimmt. Das Verhältnis dieser beiden zueinander gibt eine Aussage über ein vorhandenes Ödem.

Die meisten Versuche werden in der Weise durchgeführt, daß der perfundierte Muskel von Luft umgeben ist. Bei einigen Experimenten wird über die Oberfläche des Muskels reiner Stickstoff geblasen. Seitlich von der Meßstelle werden Deckgläschen mit Fett angeklebt, um die Luft vom Muskel zu verdrängen.

4. Bestimmung der Absorptionsbanden und der Kurvenschnittpunkte des Muskelhomogenats.

Im oxygenierten und reduzierten Homogenat wurden sowohl die Absorptionsbanden als auch die Schnittpunkte, die zwischen oxygeniertem und reduziertem Spektrum vorhanden sind, im reflektierten und durchfallenden Licht bestimmt.

Tabelle I zeigt, daß im oxygenierten Muskelhomogenat die Hauptbanden bei 582 und 543 nm liegen. Sie entsprechen der α- bzw. β-Bande des kristallinen Myoglobins (582 bzw. 544 nm nach BOWEN [5], 582 bzw. 542 nm nach THEORELL). Die Bestimmung der Absorptionsbande des desoxygenierten Myoglobins (555 nm nach BOWEN [5]) ist im Muskelhomogenat durch die Interferenz der Banden des reduzierten Cytochroms c und des reduzierten Cytochroms b_5 nicht direkt möglich. Die Werte stimmen für durchfallendes (Tabelle III) und reflektiertes Licht (Tabelle I) überein.

In Tabelle II und IV wurden die Kurvenschnittpunkte zwischen dem oxygenierten und desoxygenierten (reduzierten) Spektrum bestimmt. Die Kurvenschnittpunkte wurden mit Wechselstromkopplung gewonnen. Sie stimmen mit den echten isosbestischen Punkten überein.

Tabelle 1

Absorptionsbanden des Muskelhomogenats, bestimmt im reflektierten Licht

α-Bande	β-Bande	reduzierte Bande	Versuch vom	Bild
581	542	551	15. 2. 68	9
582	544	551	15. 2. 68	10
582	541	551	15. 2. 68	11
580	542	551	15. 2. 68	14
583	543	553	7. 2. 68	10
582	544	554	7. 2. 68	11
583	544	552	7. 2. 68	12
582	544	-	2. 2. 68	2
583	544	553	2. 2. 68	3
583	544	553	2. 2. 68	4
582	544	552	2. 2. 68	5
582	542	553	29. 1. 68	10
582	542	551	29. 1. 68	11
582	543	553	29. 1. 68	12
582	542	553	30. 1. 68	4
583	544	553	30. 1. 68	5
AM 582,1 ± 0,7	543,1 ± 1,1	552,3 ± 1,1		

Im oxygenierten Homogenat lassen sich α- und β-Banden des Myoglobins direkt bestimmen. Die Bestimmung der Absorptionsbande des reduzierten Myoglobins ist wegen der Interferenz der α-Banden des reduzierten Cytochroms c und des reduzierten Cytochroms b_5 nicht direkt möglich.

- bedeutet nicht gemessen.

Tabelle II

Kurvenschnittpunkte zwischen dem oxygenierten und reduzierten Spektrum des Muskelhomogenats, bestimmt im reflektierten Licht

					Bild
-	545	575	590	29. 1. 68	12
-	545	575	588	29. 1. 68	10
-	546	575	-	2. 2. 68	3
-	546	575	592	2. 2. 68	4
-	546	577	592	2. 2. 68	5
533	546	574	951	7. 2. 68	10
534	547	575	593	7. 2. 68	12
531	546	572	590	15. 2. 68	14
529	547	573	591	15. 2. 68	10
530	545	571	591	15. 2. 68	11
530	547	575	590	30. 1. 68	4
531	547	575	591	30. 1. 68	5
AM 531,1 ± 1,8	546,1 ± 0,8	574,3 ± 1,6	590,8 ± 1,3		

Kurvenschnittpunkte wurden mit Wechselstromkopplung gewonnen. Siestimmen mit echten isosbestischen Punkten überein.

- bedeutet nicht gemessen.

Tabelle III

Absorptionsbanden des Muskelhomogenats, bestimmt im durchfallenden Licht

α-Bande	β-Bande	reduzierte Bande	Versuch v.	Bild
582	544	550	15. 2. 68	24
582	544	550	15. 2. 68	28
582	544	551	16. 2. 68	12
583	544	550	2. 2. 68	21
583	544	-	2. 2. 68	19
-	-	551	2. 2. 68	22
583	544	551	30. 1. 68	20
581	543	550	29. 1. 68	6
582	544	550	7. 2. 68	21
582	544	551	7. 2. 68	24
581	543	551	13. 2. 68	6
582	543	551	13. 2. 68	5
582	543	551	13. 2. 68	7
M 582,1 $\pm$ 0,7	543,7 $\pm$ 0,6	550,6 $\pm$ 0,7		

- bedeutet nicht gemessen.

Tabelle IV

Kurvenschnittpunkte zwischen dem oxygenierten und reduzierten Spektrum des Muskelhomogenats, bestimmt im durchfallenden Licht

				Versuch v.	Bild
531	547	574	589	29. 1. 68	6
-	548	575	591	30. 1. 68	
-	548	574	591	2. 2. 68	21
-	548	575	587	7. 2. 68	21
530	548	575	587	7. 2. 68	24
526	549	570	594	13. 2. 68	6
525	548	574	590	15. 2. 68	24
526	546	572	589	15. 2. 68	28
-	547	573	590	16. 2. 68	12
AM	527,6 ± 2,7	547,7 ± 0,8	573,6 ± 1,7	589,8 ± 1,7	

- bedeutet nicht gemessen.

5. Absorptionsbanden und Kurvenschnittpunkte des Muskels in vivo

Die Bestimmungen der Hauptbanden und Kurvenschnittpunkte wurden am Muskel in vivo wiederholt (Tabelle V und VI). Vergleicht man alle Resultate miteinander (Tabelle VII), so zeigt sich, daß keine Unterschiede in der Lage der Absorptionsmaxima bestehen zwischen Homogenat und Muskel in vivo.

Die Werte in Tabelle VII sind eine Zusammenfassung der Tabellen I - VI. Für die α-Bande ergibt sich eine maximale Abweichung von 1,3 nm, für die β-Bande des Myoglobins von 0,6 nm, für die Bande des reduzierten Muskels von 1,7 nm. Diese Abweichungen liegen innerhalb der Fehlerbreite der Meßapparatur.

Die maximalen Abweichungen für die Kurvenschnittpunkte betragen 4,1 nm; 1,9 nm; 2,8 nm; 1,0 nm. Daß die Abweichung bei 529 nm größer ist als bei längeren Wellenlängen, dürfte daran liegen, daß in diesem Bereich schon eine Verzerrung durch Lichtstreuung deutlich wird.

Tabelle V

Absorptionsbanden des Muskels in vivo, bestimmt im reflektierten Licht

α-Bande	β-Bande	reduzierte Bande	Versuch vom	Bild
582	545	553	7. 3. 68	21
582	543	551	12. 3. 68	34
579	543	551	15. 3. 68	35
582	545	553	18. 3. 68	33
580	543	551	26. 4. 68	24
580	543	552	3. 5. 68	27
AM 580,8 $\pm$ 1,3	543,7 $\pm$ 1,0	551,8 $\pm$ 1,1		

Die α- und β-Banden des oxygenierten Myoglobins lassen sich auch im Muskel in vivo direkt bestimmen, während die Interferenz der Atmungsfermente Cytochrom c und b_5 die direkte spektralphotometrische Bestimmung der reduzierten Bande des Myoglobins im intakten, atmenden Muskel verhindert.

Tabelle VI

Kurvenschnittpunkte zwischen dem oxygenierten und reduzierten Absorptionsspektrum des intakten atmenden Muskels, bestimmt im reflektierten Licht

				Versuchv.	Bild
528	551	572	593	7. 3. 68	21
528	546	572	590	15. 3. 68	35
528	545	573	-	12. 3. 68	34
527	548	572	590	18. 3. 68	33
527	548	572	590	26. 4. 68	24
524	550	568	590	3. 5. 68	27
M 527,0 ± 1,5	548,0 ± 2,3	571,5 ± 1,7	590,6 ± 1,3		

- bedeutet nicht gemessen.

Tabelle VII

Zusammenfassung der Tabellen I bis VI

Mittelwerte der α-und β-Banden des oxygenierten Myoglobins, der Bande des reduzierten Muskels und der Kurvenschnittpunkte.

Tabelle	α-Bande	β-Bande	reduzierte Bande	
I Homogenat im reflektierten Licht	582,1	543,1	552,3	
III Homogenat im durchfallenden Licht	582,1	543,7	550,6	
V in vivo im reflektierten Licht	580,8	543,7	551,8	
Tabelle	Kurvenschnittpunkte			
II Homogenat im reflektierten Licht	531,1	546,1	574,3	590,8
IV Homogenat im durchfallenden Licht	527,6	547,7	573,6	589,8
VI in vivo im reflektierten Licht	527,0	548,0	571,5	590,6

Für die α-Bande zeigt sich eine maximale Abweichung von 1,3 mm; für die β-Bande von 0,6 nm; für die Bande des reduzierten Muskels von 1,7 nm. Diese Abweichungen liegen innerhalb der Fehlerbreite der Meßapparatur.

Die maximalen Abweichungen für die Kurvenschnittpunkte betragen 4,1 nm; 1,9 nm; 2,8 nm und 1,0 nm. Daß die Abweichung bei 529 nm größer ist als bei längeren Wellenlängen, dürfte daran liegen, daß in diesem Bereich schon ein Lichtverlust durch Streuung deutlich wird.

6. Oxygenierungsgrad des Myoglobins im perfundierten Muskel in Hypothermie ohne und mit Papaverinzusatz, gemessen an der α-Bande

Tabelle VIII zeigt, daß es unter den beschriebenen Bedingungen gelingt, das Myoglobin zu ca. 80% mit O_2 zu versorgen. Gibt man Papaverin, so steigt die O_2-Sättigung deutlich an (im Mittel 97%).

Versuch vom:	Oxygenierungsgrad	art. Temperatur	Druck	Perfusions-Geschwindigkeit	Papaverinzusatz
7. 3. 68 (9)	85,5%	26,1 ° C	65 cm H_2O	1,7 ml/min.	ohne
7. 3. 68 (2)	86,9%	25,4	65	0,8	-"-
12. 3. 68 (3)	69,9	25	105	0,8	-"-
13. 3. 68 (1)	75,95	25,2	50	1,1	-"-
15. 3. 68 (1)	75,95	23,8	94	1,1	-"-
18. 3. 68 (2)	89,6	27,0	110	0,8	-"-
18. 3. 68 (16a)	73,5	29,4	118	2,4	-"-
18. 3. 68 (22)	72,8	29,4	108	2,4	-"-
20. 3. 68 (3)	90,23	27,7	110	1,7	-"-
22. 3. 68 (3)	80,89	24,6	-	1,7	-"-
25. 3. 68 (4)	70,99	28	95	1,1	-"-
26. 3. 68 (2)	64,94	27,1	über 120	1,7	-"-
17. 4. 68	77,19	29,6	80	1,7	-"-
AM	78% ± 8,0				
26. 4. 68 (3)	100%	28,0 ° C	80 cm H_2O	1,7 ml/min.	mit
26. 4. 68 (13)	93,8	28,8	80	1,7	-"-
26. 4. 68 (17)	93,8	29,6	70	1,7	-"-
2. 5. 68 (3)	100	26,0	70	1,7	-"-
2. 5. 68 (13)	95,35	27,8	70	1,7	- "-
3. 5. 68 (3)	100	26	48	1,3	-"-
3. 5. 68 (12)	97,5	26,2	48	1,3	-"-
3. 5. 68 (18)	97,5	27	48	1,3	-"-
16. 5. 68 (2)	100	27,4	48	1,3	-"-
AM	97% ± 2,7				

7. Kinetik des Myoglobins bei Ischämie und Reperfusion in Hypothermie

Bei allen 7 Versuchen ohne Papaverinzusatz (s. Tabelle IX) beginnt die Sauerstoffabgabe des Myoglobins innerhalb von 15 Sekunden nach Beginn der Ischämie, meist schon innerhalb von 5 Sekunden. Der Ausgangsoxygenierungsgrad des Muskelfarbstoffes bewegt sich dabei zwischen 59 und 83%. Bei 4 Versuchen zeigt sich, daß der Oxygenierungsgrad von 40 bis 50% nicht unterschritten wird trotz anhaltender Ischämie (s. auch Abb. 9 in der Diskussion: Beispiel für den zeitlichen Verlauf eines Ischämiezyklus). In 2 weiteren Versuchen nähert er sich einem tieferen Wert; es werden als gemessene Endwerte 14 und 22% erreicht (Nr. 4 und Nr. 6 der Tabelle IX).

Abb. 5 zeigt die Originalspektren bei einer Ischämiereaktion mit fortlaufender Desoxygenierung des Myoglobins.

In 4 weiteren Versuchen wurde dem Perfusionsmedium Papaverin zugesetzt (Tabelle IX, Nr. 8-11). Dabei steigt die O_2-Sättigung auf 100% an. Die Reduktion des Myoglobins beginnt bei Unterbrechung der Durchströmung in keinem Fall bereits nach 5 Sekunden, sondern mit einer Ausnahme frühestens nach 30 Sekunden, in einem Versuch erst nach etwa 1 Minute.

Bei Versuch 12 und 13 wurde die Ischämiereaktion in einer äusseren Stickstoffatmosphäre um den Muskel durchgeführt. Die

Oxygenierung beträgt in diesem Fall 54 bzw. 69%. Bei der Ischämie wird das Myoglobin schon nach 120 Sekunden auf 8% bzw. nach 150 Sekunden auf 6% reduziert.

Nach Beendigung des Perfusionsstopps wird der Ausgangsoxygenierungsgrad des Myoglobins innerhalb von 60 bis 90 Sekunden wieder erreicht.

Nr. 14 der Tabelle zeigt die Ergebnisse einer Ischämiereaktion, bei 35 ^{o} C durchgeführt. Auch hier beginnt die Sauerstoffabgabe innerhalb 5 Sekunden und unterschreitet nicht den Sättigungsgrad von 45% trotz weiteren Perfusionsstopps.

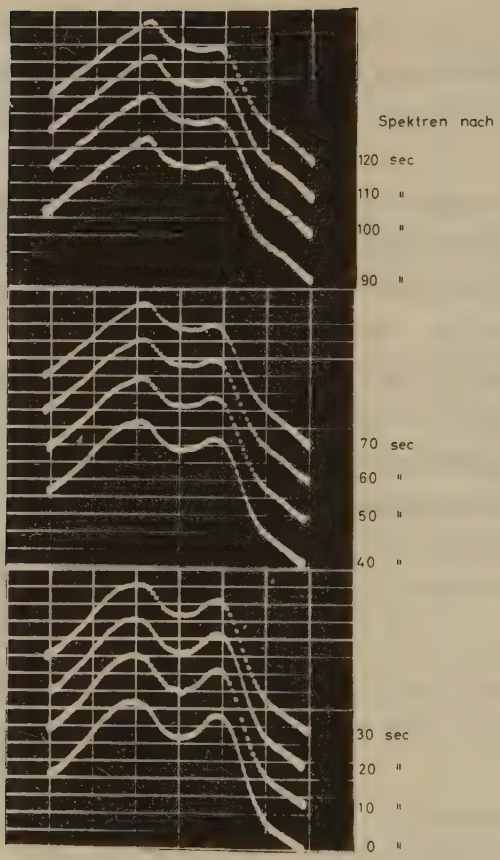

Abbildung 5

Beispiel einer Ischämie mit fortlaufender Desoxygenierung des Myoglobins im hämoglobinfrei perfundierten Musculus gastrocnemius. Zur Zeit 0 sec wird die Perfusion unterbrochen. (Spektren sind nicht ausgewertet).

Tabelle IX

Ischämiezyklus bei Hypothermie von 25 - 29 ° C

Vers. Nr.	Ausgangs-Oxygenierungsgrad	Desoxygenierung des Myoglobins nach Sekunden Ischämie in % 5 Sek.	10 Sek.	15 Sek.	30 Sek.	60 Sek.	90 Sek.	120 Sek.	150 Sek.	180 Sek.	210 Sek.	Reperfusion nach Sekunden
		ohne Papaverinzusatz										
1 7. 3. 68 (14-19)	76%	12%	-	17	25	35	-	-	-	-	-	60 S
2 7. 3. 68 (2- 7)	76%	-	-	10	24	30	31	33	-	31	-	180
3 7. 3. 68 (9-12)	74	-	-	13	21	26	33	-	-	-	-	90
4 12. 3. 68 (19-24)	67	13	-	14	23	53	-	-	-	-	-	120
5 18. 3. 68 (2- 7)	75	14	16	17	24	24	-	25	-	-	-	120
6 26. 3. 68 (3- 8)	59	-	7	-	16	37	-	-	-	-	-	60
7 19. 7. 68 (2- 8)	83	0	0	5	8	20	31	30	-	-	-	120
		mit Papaverinzusatz										
8 26. 4. 68 (3-10)	100	0	0	0	4	13	18	24	25	-	27	240
9 2. 5. 68 (3-11)	100	0	5	5	8	9	12	15	28	35	42	240
10 3. 5. 68 (3-10)	100	0	0	0	12	28	35	39	49	-	48	210
11 16. 5. 68 2-10)	100	0	0	0	0	5	5	8	12	11	19	300

Vers. Nr.	Ausgangs-Oxygenierungsgrad	Reduktion des Myoglobins nach Sekunden Ischämie in % 5 Sek.	10 Sek.	15 Sek.	30 Sek.	60 Sek.	90 Sek.	120 Sek.	150 Sek.	180 Sek.	210 Sek.	Reperfusion nach Sekunden
		in N_2-Atmosphäre durchgeführt										
12 9. 7. 68 (2- 7)	54%	12	21	23	-	28	38	46	-	-	-	-
13 25. 6. 68 (2-10)	69	-	9	20	24	29	-	45	63	-	-	-
		Normothermie										
14 12. 6. 68 (2- 7)	63	7	-	9	16	-	18	16	15	18	-	-

- bedeutet keine Messung

8. Verhalten des Myoglobins während der Kontraktion und der nachfolgenden Erholungszeit in Hypothermie.

Beträgt die Sättigung des Myoglobins um 90% oder weniger, so gibt der Muskelfarbstoff bei Hypothermie von 25 bis 29 ^{o} C einen Teil seines gespeicherten Sauerstoffs innerhalb von 5 Sekunden noch während der Kontraktion ab. Das Maximum der Abgabe wird 5 bis 10 Sekunden nach Beendigung der Arbeit erreicht (s. Tabelle X, Vers. Nr. 1 - 11). Nach dieser Zeit fängt bereits die Erholungsphase an, die 1 1/2 bis 5 Minuten dauert. Dann hat das Myoglobin wieder seine Ausgangssättigung erreicht. Bei einigen Versuchen erholt sich der Muskel jedoch nicht völlig. Abb. 6 zeigt den zeitlichen Verlauf eines Reizzyklus.

Liegt der Ausgangsoxygenierungsgrad höher als 90%, so ergibt sich bei einem Tetanus von 5 Sekunden Dauer keine deutliche Reduktion (s. Versuch Nr. 12, 14, 15). Erst bei Steigerung der Arbeit durch einen längeren Tetanus ist eine meßbare Entsättigung zu verzeichnen. Die Erholungsphase der Wiederaufsättigung des Myoglobins ist auch hier nach etwa 2 Minuten beendet (Nr. 13 und 16).

In einigen Versuchen wurde der Beginn der Sauerstoffabgabe während der Arbeit des Muskels bei Hypothermie genauer bestimmt. Wie aus der folgenden Tabelle XI hervorgeht, beginnt in keinem der 9 Versuche eine meßbare Entsättigung innerhalb der ersten Sekunde, sondern frühestens zwischen der ersten und zweiten Sekunde nach Beginn der Kontraktion. Die Werte von 3% und 1,5%

Reizzyklus

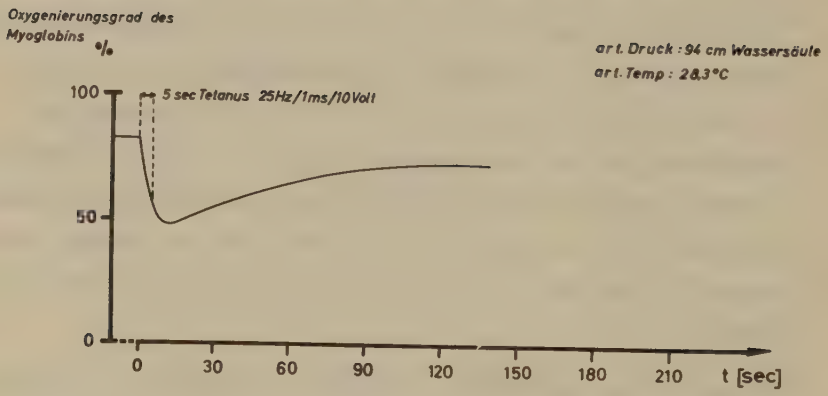

Abbildung 6

Beispiel eines Reizzyklus

Desoxygenierung des Myoglobins bei einem Tetanus von 5 Sekunden und langsame Wiederaufsättigung in der Erholungsphase.
Der Beginn der Entsättigung ist nach der ersten Sekunde.

(Nr. 2 und Nr. 6 der Tabelle), nach 1 Sekunde gemessen, liegen innerhalb der Fehlerbreite, die durch die Auswertmethode bedingt ist. Um jegliche fehlerhafte Zeitdifferenz zu vermeiden, wurden Muskelkontraktion und Spektrenaufnahme über einen gemeinsamen Auslöser gestartet.

Setzt man gleichzeitig und gleichlang mit dem Reiz eine Ischämie, indem man die Perfusion abklemmt, so verläuft die Entsättigungskurve des Myoglobins etwas steiler, d.h., das Myoglobin gibt mehr Sauerstoff ab als ohne Ischämie. (Tabelle XII Ischämie und Reiz simultan und Abb. Nr. 8).

Tabelle X

Reizzyklen

Vers. Nr.	Ausgangs-Oxygenierungsgrad	Tetanusdauer	Desoxygenierung des Myoglobins in % nach Sekunden 5 Sek.	10 Sek.	15 Sek.	30 Sek.	60 Sek.	90 Sek.	120 Sek.	Endoxygenierungsgrad	erreicht nach Sekunden
1 13. 3. 68 (21-26)	81%	5 s	10	-	18	19	14	10	3	81%	210
2 15. 3. 68 (11-19)	77	5	12	29	29	20	16	17	17	69	180
3 15. 3. 68 (19a-24)	67	5	26	33	31	-	15	13	13	54	80
4 18. 3. 68 (12-15)	55	5	11	15	19	22	7	-	-	52	100
5 15. 3. 68 (27)	83	5	16	35	35	29	20	11	11	72	90
6 18. 3. 68 (27-31)	70	5	-	-	55	37	22	-	-	50	80
7 20. 3. 68 (13-18)	92	5	-	-	43	40	35	32	19	89	300
8 20. 3. 68 (19-25)	91	5	-	42	41	-	31	28	24	88	225
9 20. 3. 68 (26-31)	76	3	-	-	32	25	11	9	-	76	135
10 19. 7. 68 (9-14)	84	3	-	-	35	38	21	9	6	84	135
11 19. 7. 68 (22-28)	77	3	-	31	31	24	22	19	10	71	135

Vers. Nr.	Ausgangs-Oxygenierungsgrad	Tetanusdauer	Desoxygenierung des Myoglobins in % nach Sekunden 5 Sek.	10 Sek.	15 Sek.	30 Sek.	60 Sek.	90 Sek.	120 Sek.	Endoxygenierungsgrad	erreicht nach Sekunden
12 26. 4. 68 (13-16)	94%	5 s	6	6	10	6	0	-	-	94	60
13 26. 4. 68 (17-21)	94	10	-	12	20	19	4	-	4	96	150
14 2. 5. 68 (13-17)	95	Kein erkennbarer Reizeffekt									
15 16. 5. 68 (12-14)	97	5	0	0	3	Kein erkennbarer Reizeffekt					
16 16. 5. 68 (16-19)	97	10	13	12	-	15	9	9	9	92	135
		Normothermie									
	64	4	12	17	15	12	9	8	8	63	195

Tabelle XI

Beginn der Sauerstoffabgabe

Vers. Nr.	Ausgangsoxygenierungsgrad	Tetanusdauer	Desoxygenierung des Myoglobins in % nach Sekunden 1 Sek.	2 Sek.	3 Sek.	4 Sek.	5 Sek.	6 Sek.	10 Sek.	15 Sek.
1 20. 3. 68 (13-18)	92%	5 s	–	17	–	25	–	47	–	41
2 20. 3. 68 (19-25)	91	5	3	16	21	–	–	–	42	41
3 20. 3. 68 (26-31)	76	3	0	8	10	–	–	–	–	32
4 19. 7. 68 (9-14)	84	3	0	0	2	–	–	–	–	35
5 19. 7. 68 (22-28)	77	3 0,1 Sek. 0,2 0,3 0 0 0	–	–	–	–	–	–	31	31
6 18. 3. 68 (27-31)	70	5	1,5	16	16	–	–	–	–	55
7 26. 3. 68 (24-25)	59	2 0,3 Sek. 0,6 0,9 0 0 0	–	–	–	–	–	–	–	43
8 22. 7. 68 (9-10)	76	3	0	10	11	–	–	–	–	24
9 22. 7. 68 (14-15)	63	3 0,3 Sek. 0,6 0,9 0 0 0	–	–	–	–	–	–	–	– nach 40 Sek. 20%

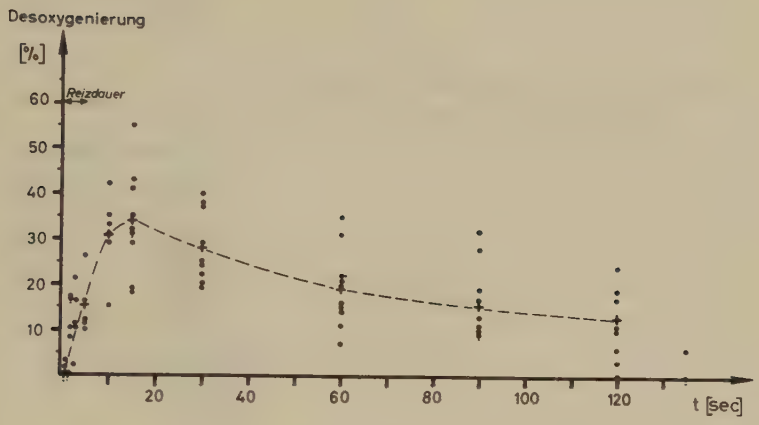

Abbildung 7

Graphische Darstellung der gesamten Reizversuche.

Zur Tabelle Nr. X

Es sind nur die Versuche berücksichtigt, deren Ausgangsoxygenierungsgrad 90% oder weniger beträgt.

Dauer des Tetanus : 3 bzw. 5 Sekunden

arterielle Temperatur: 25 bis 29 ^{o} C

Ein kleiner Punkt unter oder neben einem großen bedeutet, daß dieser Wert nochmals gemessen wurde. Die gestrichelte Kurve stellt die aus den gesamten Reizversuchen errechnete Mittelwertskurve dar. Ihr Verlauf deckt sich mit der Darstellung eines einzelnen Reizversuches (s. Abb. 6).

Tabelle XII

Ischämie und Reiz simultan

Vers. Nr.	Ausgangsoxy-genierungsgrad	Tetanus und Ischämie	Reduktion des Myoglobins in % nach Sekunden 5 Sek.	10 Sek.	15 Sek.	30 Sek.	60 Sek.	90 Sek.	120 Sek.	Endoxygenie-rungsgrad	erreicht nach Sekunden
1 18. 3. 68 (16a-20)	74%	5 s	26	35	-	23	-	11	4	75	150
2 3. 5. 68 (12-16)	98	5	15	30	29	24	-	8	8	93	135

Vergleich der Entsättigung des Myoglobins
bei Reiz mit und ohne Ischämie

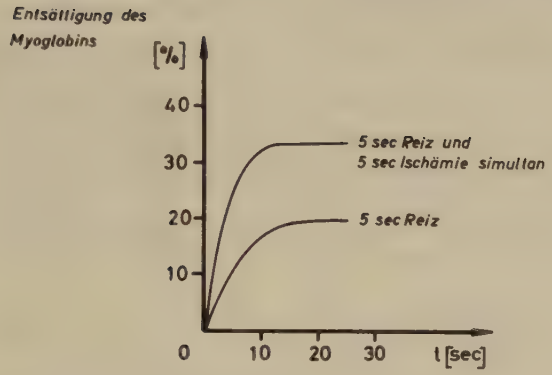

Abbildung 8

Zur Tabelle Nr. XII Ischämie und Reiz simultan.

9. Durchblutung und Kontraktion

Während der Kontraktion wurde gleichzeitig der Frage der Durchblutungsänderung nachgegangen. Bei Auszählung der Tropfenzahl aus dem venösen Katheter (aus der Vena cava inferior) während der Kontraktion ergab sich keine Änderung gegenüber der Zahl vor der Kontraktion, bei gleichbleibender arterieller Perfusionsgeschwindigkeit durch die Perfusionspumpe. Der arterielle Druck blieb während der Kontraktion gleich hoch und senkte sich dann einige Sekunden später.

IV. Diskussion

Wie die Bestimmungen der Absorptionsbanden zeigen, ist das Myoglobin im atmenden Muskel spektralphotometrisch meßbar, wenn man das Hämoglobin durch Perfusion entfernt und somit die photometrische Überlagerung der beiden Farbstoffe beseitigt. Die gemessenen Banden des Myoglobins im Muskelhomogenat stimmen mit den von THEORELL und BOWEN angegebenen Wellenlängen überein, die am extrahierten, reinen Muskelfarbstoff bestimmt wurden. Es gelang uns, das Hämoglobin, dessen α-Bande bei 577 nm liegt, vollständig auszuspülen. Dies bestätigte histologisch sich durch Schnitte durch den perfundierten Muskel, in denen keine Erythrocyten mehr nachweisbar waren.

Die gemessenen Kurvenschnittpunkte stimmen mit den isosbestischen Punkten überein.

Bei der Erfassung der Kinetik des Myoglobins bei Ischämie (s. Abb. 9) ergab sich bei einigen Versuchen, daß das Myoglobin nur bis auf 40 bis 50% entsättigt wurde, trotz anhaltenden Perfusionsstopps. Da von den Kapillaren her kein Sauerstoff mehr geliefert wird und eine anaerobe Glykolyse bei einem noch vorhandenen Sauerstoffreservoir unwahrscheinlich ist, muß mit einer Diffusion von außen aus der umgebenden Atmosphäre gerechnet werden.

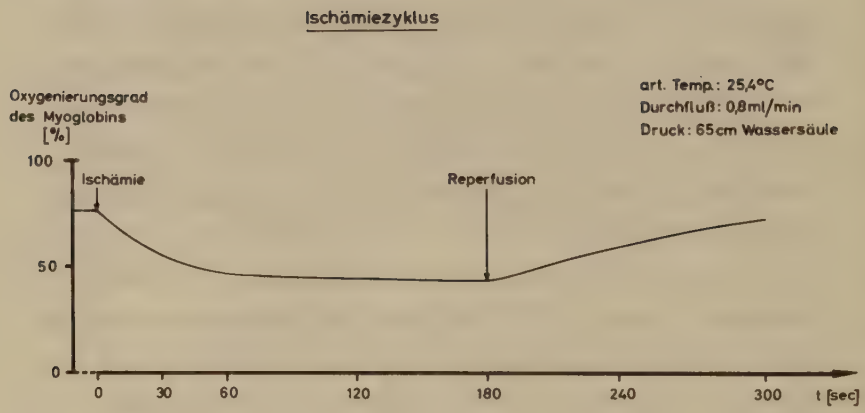

Abbildung 9

Beispiel eines Ischämiezyklus.

Desoxygenierung und Reoxygenierung des Myoglobins bei Ischämie und Reperfusion in Abhängigkeit von der Zeit. Eine vollständige Reduktion wird nicht erreicht, da das Muskelpräparat in Kontakt mit Luft ist.

Daß unter bestimmten zirkulatorischen Bedingungen eine echte Konkurrenz zwischen dem von innen durch die Perfusion gelieferten und dem von außen eindringenden Gas besteht, zeigen zwei Kontrollversuche, die in einer Stickstoffatmosphäre durchgeführt wurden und die eine völlige Entsättigung aufweisen. Daraus ist zu schließen, daß bei schlechten zirkulatorischen Bedingungen aus der umgebenden Luft Sauerstoff in die oberflächlichen Schichten des Gewebes diffundiert. (Nur die oberflächlichen Schichten werden mit dem Photometer erfaßt. Die Eindringtiefe des Lichtes beträgt ca. 1mm). Bei guter Mikrozirkulation diffundiert im wesentlichen der Perfusionssauerstoff an das Myoglobin, während die Diffusion aus der Luft keine wesentliche Rolle spielt. Unter diesen Bedingungen kann man eine fast völlige Desoxygenierung auch experimentell erzielen.

Um beurteilen zu können, in welchem Bereich das Myoglobin als intrazellulärer Indikator für die Zellatmung bzw. O_2-Versorgung des Muskels angesehen werden kann, ist in der Abb. 10 das Sauerstoffbindungsvolumen des perfundierten Gastrocnemius in Abhängigkeit vom Sauerstoffdruck dargestellt. Es wird dabei von einer Myoglobinkonzentration von 1 mg/g Muskel Frischgewicht ausgegangen.+ Der Berechnung

+ In anderem Zusammenhang haben wir zusammen mit Frau Dr. H. Starlinger den Myoglobingehalt des Gastrocnemiusmuskels der Ratte nach der Methode von DE Duve[7], in der Modifikation von Blessing [4], bestimmt. Sowohl im durchbluteten als auch im hämoglobinfrei perfundierten Muskel fanden sich Myoglobinwerte von durchschnittlich 1 Milligramm pro Gramm Muskel Frischgewicht.

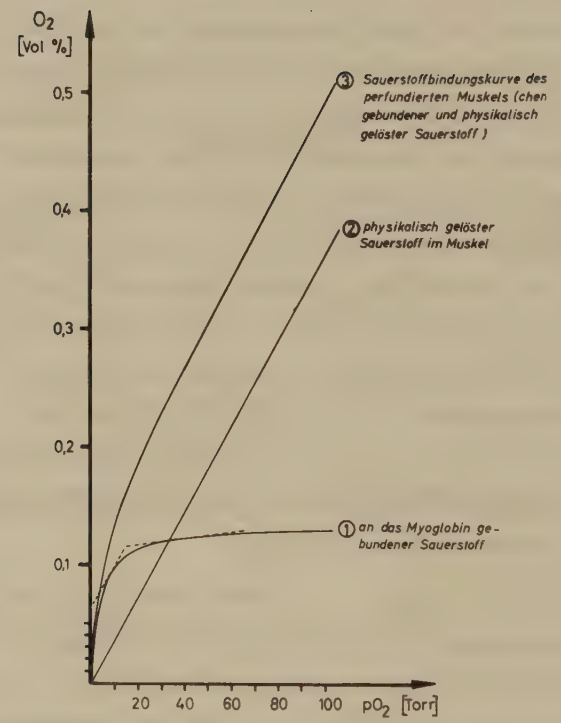

Abbildung 10

Kurve 1 zeigt die Myoglobinbindungskurve, Kurve 2 die Menge des physikalisch gelösten Sauerstoffes

Kurve 3 Addition von 1 und 2

Die Ordinate ist im Volumenprozent angegeben. Die gestrichelten Linien stellen Tangenten an die Myoglobinbindungskurve dar.

des chemisch an den Muskelfarbstoff gebundenen Sauerstoffes in Volumenprozent wird ein Molekulargewicht des Myoglobins von 16900 [2] zugrunde gelegt. Die Kurve des physikalisch gelösten Sauerstoffes im Muskel ist mit dem Löslichkeitskoeffizienten [1] für Wasser bei 27 ^{o} C = 0,02736 ml O_2 pro ml Muskel und 760 mm Hg errechnet.

Legt man an zwei ausgezeichneten Punkten der Myoglobinbindungskurve Tangenten (s. gestrichelte Linien in der Abb. 10), so sieht man, daß z. b. bei 8 Torr beide Kurven (Kurve 1 und 2) die gleiche Steilheit besitzen. Wird die Tangente bei 30 - 33 Torr angelegt, so beträgt die Steilheit der Bindungskurve nur noch 1/10 derjenigen des physikalisch gelösten Sauerstoffes.

Die Menge von chemisch gebundenem zu physikalisch gelöstem O_2 verhält sich bei "arteriellem" pO_2 von 108 Torr wie 1:3. Bei 33 Torr sind gleichviel O_2 chemisch gebunden und physikalisch gelöst. Erst bei niedrigeren Drucken ist mehr chemisch gebundener als physikalisch gelöster O_2 vorhanden, z. B. bei 8 Torr 3:1.

Das Myoglobin ist somit erst bei Sauerstoffdrucken unter 30 Torr als Indikator brauchbar. Er ist umso wirkungsvoller, je niedriger der Sauerstoffdruck wird. Bei höherem O_2 - Druck ist das Myoglobin als Indikator für den O_2-Verbrauch ungeeignet, da in diesem Fall der physikalisch gelöste Sauerstoff zur Deckung eines plötzlich auftretenden Bedarfs herangezogen wird.

Diese theoretische Erörterung steht in Übereinstimmung mit unseren Versuchsergebnissen, daß bei einem hohen Sättigungsgrad des Myoglobins von mehr als 90% die Entsättigung bei Unterbrechung der Durchströmung bei Hypothermie nicht sofort, (d.h. nicht innerhalb von 5 Sekunden) beginnt, sondern mit einer Ausnahme frühestens nach 30 Sekunden, in einem weiteren Versuch erst nach 1 Minute. Unter diesen Bedingungen wird also zunächst der physikalisch gelöste Sauerstoff veratmet, bis in der Zelle der O_2-Druck erreicht wird, bei dem die Menge des physikalisch gelösten der des chemisch gebundenen gleich ist. Erst jetzt kann das Myoglobin seine Speicherfunktion erfüllen. Beträgt der Sättigungsgrad weniger als 90%, beginnt die Sauerstoffabgabe des Myoglobins bei Perfusionsstopp bereits innerhalb der ersten 5 Sekunden in Hypothermie, da dann die gelöste Menge für die geringe Ruheatmung des Muskels nicht mehr ausreicht.

Läßt man den Muskel arbeiten und betrachtet dabei die Entsättigung des Myoglobins als Indikator für die Steigerung der Atmungsgeschwindigkeit, so findet man auch hier, daß bei einem Oxygenierungsgrad von mehr als 90% bei einem Tetanus von 5 Sekunden keine Entsättigung erfolgt, sondern erst bei einem längeren Tetanus von 10 Sekunden, da für die kürzere Arbeitsleistung zunächst der gelöste Sauerstoff in der Zelle ausreicht. Dagegen erfolgt eine Entsättigung bei niedrigerem Sättigungsgrad auch schon bei kurzem Tetanus. Unsere Versuche haben ergeben, daß unter geeigneten Bedingungen das Myoglobin während der Muskelkontraktion als Indikator für

die zeitliche Änderung der Gewebsatmung verwendet werden kann.

Da der O_2-Druck von dem arteriellen zu dem venösen Kapillarende und senkrecht zur Kapillare ins Gewebe hin abfällt, wird mit der O_2-Sättigung des Myoglobins im Bereich von 2 mal 3 mm^2 nur ein Mittelwert gemessen. Legt man das experimentell von KUNZE [15] ermittelte pO_2-Druckfeld im durchbluteten menschlichen Muskel zu Grunde, so ergibt sich, daß bei Normothermie (Abb. 11) 50% des Myoglobins 100% gesättigt und nur 12% unter 70% gesättigt sind. Dabei wurden 12% gleichmäßig auf die Sättigungen verteilt, da genauere Angaben nicht vorliegen. Aus der Häufigkeitsverteilung der Myoglobinsättigung (Abb. 11) erhält man durch Integration die "mittlere" Myoglobinsättigung +

$$\bar{s} = \int_0^1 s \, \alpha(s) \, ds.$$

Dabei ist s der Bruchteil des mit O_2 gesättigten Myoglobins und $\alpha(s)$ die Kurve der Häufigkeitsverteilung der Myoglobinsättigung.

Nach der Abbildung 11 erhalten wir für das obige Integral:

0,5.0,95 = 0,475
0,3.0,85 = 0,255
0,08.0,75 = 0,060
0,017.0,65 = 0,011
0,017.0,55 = 0,009
0,017.0,45 = 0,008
0,017.0,35 = 0,006
0,017.0,25 = 0,004
0,017.0,15 = 0,002
0,017.0,05 = 0,001
$\bar{s}$ = 0,83

+ Herrn Dr. R. Wodick danke ich für die Hilfe bei der Berechnung der mittleren Myoglobinsättigung.

Häufigkeitsverteilung der Myoglobinsättigung im gesunden durchbluteten Muskelgewebe

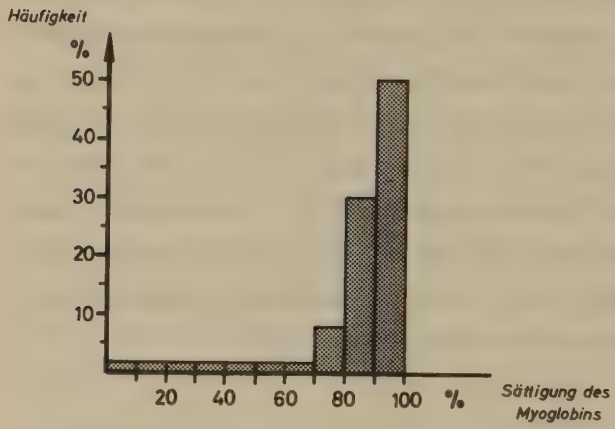

Abbildung 11

Häufigkeitsverteilung der Myoglobinsättigung im gesunden durchbluteten Muskelgewebe bei Normothermie.

Die Myoglobinsättigung ist nach dem von KUNZE experimentell ermittelten pO_2-Druckfeld im durchbluteten menschlichen Muskel errechnet worden.

(nach KUNZE, K: Das Sauerstoffdruckfeld im normalen und pathologisch veränderten Muskel. Habilitationsschrift Grüßen 1967, Abb. 100)

Der Mittelwert der Myoglobinsättigung im normalen durchbluteten menschlichen Muskel beträgt

$$\bar{s} = 83\%$$

Die Myoglobinsättigung ist in unseren Versuchen vergleichbar groß. Abb. 11 zeigt, welche starken lokalen Unterschiede in der Sättigung zu erwarten sind, über die bei der Messung gemittelt wird.

Unsere Versuche zur eigentlichen Fragestellung, wann das Myoglobin seinen Sauerstoff bei Kontraktion abgibt, haben gezeigt, daß das Musekelpigment bei entsprechender Inkikatorempfindlichkeit einen Teil des benötigten Sauerstoffes schon während der Muskelzuckung abgibt. Das Maximum der Entsättigung liegt 5 bis 10 Sekunden nach Beendigung der Arbeit. Der genaue Beginn der meßbaren Sauerstoffabgabe, der nach unseren Versuchen bei Hypothermie von 25 - 29° C frühestens nach 1 Sekunde erfolgt, muß mit Kritik betrachtet werden. Da man dabei eine O_2-Diffusion von außen nicht ausschließen kann, besteht die Möglichkeit, daß der Beginn der Sauerstoffabgabe noch früher liegt. MILLIKAN gab aufgrund seiner Versuche den Beginn mit weniger als 1/5 Sekunde an. Doch ist auch dieser Wert wegen der unzulänglichen Methodik kritisch zu betrachten. Erst weitere Experimente, bei denen man eine Diffusion von außen verhindert, können die exakten Werte ermitteln.

Der steilere Verlauf der Entsättigungskurve des Myoglobins bei simultaner Ischämie und Kontraktion gegenüber der alleinigen Kontraktion (s. Abb. 8) weist daraufhin, daß während der Muskelarbeit kein Durchblutungsstopp eintritt. Auch die Konstanz der Tropfenzahl und des Perfusionsdruckes während der Muskelzuckung sprechen gegen eine Reduktion der Durchströmung. Dagegen deutet die nachfolgende Druckerniedrigung auf eine Weitstellung der Arteriolen, wohl aufgrund einer Anhäufung von Stoffwechselprodukten, da eine zentrale Beeinflussung durch die Isolierung des Organes ausgeschlossen ist.

V. Zusammenfassung

1. Es wird eine Methode beschrieben, mit der es möglich ist, das Myoglobin im atmenden, intakten Skelettmuskel als intrazellulären Indikator für die Änderung der Gewebsatmung darzustellen.

2. Das Myoglobin ist als intrazellulärer Sauerstoffindikator nur bei einem Sättigungsgrad von weniger als 90%, bzw. bei einem Sauerstoffdruck von weniger als 33 bis 30 Torr in der Muskelzelle des Gastrocnemius der Ratte geeignet. Bei höheren Werten ist die Menge des physikalisch gelösten Sauerstoffes noch so hoch, daß bei einer bestimmten Arbeitsleistung zunächst diese O_2-Menge verbraucht wird, ohne daß der O_2-Druck soweit absinkt, daß das Sauerstoffreservoir des Myoglobins angegriffen wird. Erst bei höherer Arbeitsleistung sinkt der pO_2 soweit, daß auch der chemisch gebundene Sauerstoff abgegeben und veratmet wird. Bei diesem O_2-Druck ist im Musculus gastrocnemius die Menge des physikalisch gelösten und die des chemisch gebundenen Sauerstoffes gleich groß.

3. Die Sauerstoffabgabe des Myoglobins bei entsprechender Indikatorempfindlichkeit beginnt bei einem Tetanus von 3 bzw. 5 Sekunden schon während der Kontraktion. Der meßbare Beginn erfolgt nach unseren Versuchen in Hypothermie von 25 bis 29 ^{o} C frühestens nach 1 Sekunde nach Beginn der Kontraktion. Dieser Wert ist wegen einer möglichen

Sauerstoffdiffusion aus der umgebenden Luft mit Kritik zu betrachten.

4. Das Maximum der Sauerstoffabgabe des Myoglobins liegt nach Beendigung der Muskelarbeit. Nach 5 bis 10 Sekunden nach Kontraktionsende schließt sich die Erholungsphase an mit Wiederaufsättigung des Myoglobins.

5. Während der Kontraktion erfolgt keine Durchströmungsveränderung im isolierten, mit konstantem Volumen perfundierten Muskel. Der Perfusionsdruck bleibt dabei weitgehend unverändert.

VI. L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

1. BARTELS, H., E. BÜCHERL, C. W. HERTZ, G.RODEWALD und M. SCHWAB:
Lungenfunktionsprüfungen. Methoden und Beispiele klinischer Anwendung.
Springer Verlag Berlin Göttingen Heidelberg (1959)

2. Biochemisches Taschenbuch I, II
Herausgeber: M. Rauen
Springer Verlag Berlin (1964)

3. BIÖRCK, G.: On Myoglobin and its Occurrence in man
Acta med. Scand., Suppl 226, 133, 1-216 (1949)

4. BLESSING, M. H.: Über den Myoglobingehalt des Herzmuskels des Menschen
Arch. Kreisl.-Forsch. 52, 236 (1967)

5. BOWEN, W. J.: The Absorption Spectra and Extinction Coefficients of Myoglobin
J. Biol. Chem. 179, 235-245 (1949)

6. DRABKIN, D. L.: Crystalline human Haemoglobin and Myoglobin. Standardisation of the Haemoglobins and Denaturation Studies.
Fed. Proc. 4, 88 (1945)

7. DE DUVE, C.: Spectrophotometric Metod for the simultaneous Determination of Myoglobin and Haemoglobin in Extracts of human Muscle.
Acta chem. Scand. 2, 264-289 (1948)

8. FABEL, H., D. W. LÜBBERS: Measurements of reflection spectra of the beating rabbit heart in situ.
Bio. Z. 341,351-356 (1965)

9. HILL, R.: Oxygen Affinity of Muscle Haemoglobin
Nature 132, 897 (1933)

10. HILL, R.: Oxygen Dissociation Curves of Muscle Haemoglobin
Proc. Roy. Soc., London, s. B. 120, 472 (1936)

11. JÖBSIS, F. F.: Spectrophotometric studies in intact muscle
J. Gen. Physiol. 46, 929-969 (1963)

12. KLINGENBERG, M., D. W. LÜBBERS: Oxydative Endstrecke des Stoffwechsels
In: Glucose und verwandte Verbindungen in Medizin und Biologie
Herausgeber: H. Bartelheimer, W. Heyde, W. Thorn
Ferdinand Enke-Verlag (1966)

13. KNAUST, K.: Sauerstoffversorgung des hämoglobinfrei perfundierten Meerschweinchengehirns bei Normo- und Hypothermie.
Dissertation Marburg (1967)

14. KOCH, R. G. BOITEN, A. G. BIERMASZ, G. P. ROSZBACH, G. W. VAN SANTEN: Dehnungsmeßstreifenmeßtechnik Ausgabe der N.V. Philips' Gloeilampenfabrieken Eindhoven (1951)

15. KUNZE, K.: Das Sauerstoffdruckfeld im normalen und pathologisch veränderten Muskel. Untersuchungen mit einer neuen Methode zur quantitativen Erfassung der Hypoxie in situ.
Habilitationsschrift Gießen (1967)

16. LÜBBERS, D. W. und W. NIESEL:Ein Kurzzeit-Spektralanalysator zur Registrierung rasch verlaufender Änderungen der Absorption
Naturwiss. 44, 60 (1957)

17. LÜBBERS, D. W.: Die Gewebsatmung der Herzmuskelfaser
In: Bad Oeynhausener Gespräche II vom 18. bis 19. Oktober 1957
Springer Verlag Berlin, Göttingen, Heidelberg (1958)

18. LÜBBERS, D. W. und W. NIESEL: Der Kurzzeit-Spektralanalysator. Ein schnell arbeitendes Spektralphotometer zur laufenden Messung von Absorptions- beziehungsweise Extinktionsspektren
Pflügers Arch. ges. Physiol. 268, 286 (1959)

19. LÜBBERS, D. W., H. FABEL: Redoxveränderungen der Atmungskette während Normoxie und Hypoxie am schlagenden Warmblüterherzen in situ
Verhandlungen der deutschen Gesellschaft für Kreislaufforschung, 30. Tagung 198 (1964)

20. MILLIKAN, G. A.: The Kinetics of Muscle Haemoglobin
Proc. Roy. Soc. London, s. B. 120, 366 (1936)

21. MILLIKAN, G. A.: Experiments on Muscle Haemoglobin in vivo; the Instantaneous Measurement of Muscle Metabolism
Proc. Roy. Soc. London, S. B. 123, 218 (1937)

22. NIESEL, W., G. THEWS und D. W. LÜBBERS: Die Messung des zeitlichen Verlaufs der O_2-Aufsättigung und O_2-Entsättigung menschlicher Erytrozyten mit dem Kurzzeit-Spektralanalysator
Pflügers Arch. ges. Physiol. 268, 296 (1959)

23. NIESEL, W., D. W. LÜBBERS, D. SCHNEEWOLF, J. RICHTER und W. BOTTICHER: Double Beam spectrometer with 10 msec recording time.
J. Rev. Scient. Instrum. 35, 578 (1964)

24. OPITZ, E. und D. W. LÜBBERS: Allgemeine Physiologie der Zell- und Gewebsatmung
In: Handbuch der Allgemeinen Pathologie 4, 2. Teil (1957)
Herausgeber: Büchner, Letterer, Roulet

25. POEL, W. E.: Effect of Anoxic Anoxia on Myoglobin Concentration in Striated Muscle
Amer. J. Physiol. 156, 44 (1949)

26. SCHWICKARDI, D.: Konzentration und Kinetik der Atmungsfermente am isoliert perfundierten Meerschweinchengehirn in vivo und in Hypothermie von 18° C
Dissertation Marburg 1967)

27. THEORELL, H.: Kristallinisches Myoglobin.
I. Mitteilung. Kristallisieren und Reinigung des Myoglobins sowie vorläufige Mitteilung über sein Molekulargewicht
Biochem. Z. 252, 1 (1932)

28. THEORELL, H.: Kristallinisches Myoglobin .
II. Mitteilung. Sedimentationskonstante und Molekulargewicht des Myoglobins
Biochem. Z. 268, 46 (1934)

29. THEORELL, H.: Krista-llinisches Myoglobin.
III. Mitteilung. Die absolute Lichtabsorption von Oxy-, CO-, Meta- und reduziertem Myoglobin.
Biochem. Z. 268, 55 (1934)

30. THEORELL, H.: Kristallinisches Myoglobin.
IV. Mitteilung. Myoglobin im Gleichgewicht mit Sauerstoff und Kohlenoxyd.
Biochem. Z. 268, 64 (1934)

31. THEORELL, H.: Kristallinisches Myoglobin.
V. Mitteilung. Die Sauerstoffbindungskurve des Myoglobins
Biochem. Z. 268, 73 (1934)

32. WODICK, R.: Die Auswertung von Mehrkomponentensystemen der Kurzzeitspektrophotometrie
Dissertation Marburg (1968)

N a c h t r a g :

33. BOWEN, W. J.: Notes an Myoglobin Preparation and Iron Content.
J. Biol. Chem. 176, (1948)

34. GROTE, HUHMANN und NIESEL:
Zur Funktion des Myoglobins.
Pflügers Arch. Ges. Physiol. 294, 256 (1967)

35. KENDREW, J. C.: Structure and Function in Myoglobin and other Proteins.
Fed. Proc. 18, 740 (1959)

36. KENDREW, J. C.: Myoglobin and the Structure of Proteins.
Sci. 139, 1259 (1963)

37. REICHEL, H.: Muskelphysiologie
Springer Verlag Berlin (1960)

38. REIN, H. und M. SCHNEIDER: Einführung in die Phyiologie des Menschen
Springer Verlag Berlin (1960)

39. SCOULOUDI, H.: The Myoglobin Molecule.
Nature 183, 372 (1959)

40. WITTENBERG, J. B.: Myoglobin-Facilitated Diffusion of Oxygen.
J. general Physiol. Part. II, 491, 57 (1965)

Meinem Lehrer, Herrn Prof. Dr. med. Lübbers, darf ich herzlich danken für die Überlassung des Themas und für seine vielen Anregungen und Ratschläge bei der Entwicklung der Methodik und Durchführung der Versuche sowie bei der Interpretation der Ergebnisse.

Den Angehörigen des Institutes danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und für die Bereitstellung der für die Versuche benötigten Geräte.

Lebenslauf

Am 25. 9. 1942 wurde ich als drittes Kind des Karl Follert und seiner Ehefrau Katharina in Seligenstadt /Hessen geboren.

Von Ostern 1949 an besuchte ich fünf dreiviertel Jahre die Volksschule in Seligenstadt, wechselte im Dezember 1954 in die zweite Klasse der Realschule über, die ich mit Abschluß der Mittleren Reife Ostern 1959 verließ. Anschließend trat ich in die Obersekunda des neusprachlichen Zweiges des Einhard-Gymnasiums in Seligenstadt ein. Im Februar 1962 legte ich die Reifeprüfung ab. Im Sommersemester 1962 begann ich an der Philipps-Universität in Marburg das Studium der Medizin und beendete es nach 11 Semestern im Dezember 1967 mit dem ärztlichen Staatsexamen.

Seit Januar 1968 war ich als Medizinalassistentin 7 Monate im Institut für Angewandte Physiologie und 4 Monate in der Universitäts-Frauenklinik in Marburg tätig. Zur Zeit absolviere ich die Chirurgische Pflichtzeit in der Chirurgischen Klinik der Städtischen Krankenanstalten Dortmund.

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Herren Professoren und Dozenten:

Amon, Beckmann, Berendes, Betz, Bommer, Braun-Falco, Brück, Bücher, Buchholz, Dimroth, Dittrich, Dölle, Drawert, Exner, Ganz, Gedigk, Golenhofen, Hamm, Hardewig, Hartmann, Hensel, Herrmann, Hettler, Heuser, Hildebrandt, Hohorst, Jacob, Karlson, Klingenberg, Knauff, Lang, Linneweh, Löhr, Lübbers, Mahr, Mann, Martini, Marx, Mattes, du Mesnil de Rochement, Neubauer, Niessing, Nocke, Oehmig, Petry, Pots, Rodeck, Roger, Rohen, Salfeld, Sauer, Schiff, Schleyer, Schmid, Schrappe, Schultze, Schwaiger, Seidel, Siegert, Siess, Spiegelberg, Straub, Steicher, Strohmeyer, Vogt, Walcher, Wendt, Würtele.